

## DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC AGENT FOR CANCER

Patent Number: JP6172218

Publication date: 1994-06-21

Inventor(s): MURAMATSU TAKASHI; others: 03

Applicant(s): MITSUI TOATSU CHEM INC; others: 01

Requested Patent:  JP6172218

Application Number: JP19920270492 19921008

Priority Number(s):

IPC Classification: A61K39/395; G01N33/53; G01N33/574

EC Classification:

Equivalents:

---

### Abstract

---

**PURPOSE:** To provide a diagnostic and therapeutic agent for cancers, containing anti-MK protein antibody as an active ingredient.

**CONSTITUTION:** An animal is immunized with MK protein which is a growth and differentiation factor originating from mouse terato-carcinoma cell and the blood sample is taken from the immunized animal. Or spleen cells from the immunized animal are fused with myeloma cells to prepare a hybridoma which can produce anti-MK-monoclonal antibody and the antibody is obtained from the hybridoma. The antibody is used to detect MK antigen in the tissue or cells extracted from the patients or the blood or thoracic liquid from the patients. Further, these antibodies or their fragments as such, or their complex with anticancer agent or toxins are given to the patients to effect the therapy and inhibit the proliferation of the cancer.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06172218 A**

(43) Date of publication of application: **21 . 06 . 94**

(51) Int. CI

**A61K 39/395  
G01N 33/53  
G01N 33/574**

(21) Application number: **04270492**

(22) Date of filing: **08 . 10 . 92**

(71) Applicant: **MITSUI TOATSU CHEM  
INC MURAMATSU TAKASHI**

(72) Inventor: **MURAMATSU TAKASHI  
MURAMATSU TOSHIKO  
MARUTA HIROSHI  
AWAYA AKIRA**

**(54) DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC AGENT FOR  
CANCER**

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To provide a diagnostic and therapeutic agent for cancers, containing anti-MK protein antibody as an active ingredient.

**CONSTITUTION:** An animal is immunized with MK protein which is a growth and differentiation factor originating from mouse terato-carcinoma cell and the blood sample is taken from the immunized animal. Or spleen cells from

the immunized animal are fused with myeloma cells to prepare a hybridoma which can produce anti-MK-monoclonal antibody and the antibody is obtained from the hybridoma. The antibody is used to detect MK antigen in the tissue or cells extracted from the patients or the blood or thoracic liquid from the patients. Further, these antibodies or their fragments as such, or their complex with anticancer agent or toxins are given to the patients to effect the therapy and inhibit the proliferation of the cancer.

**COPYRIGHT:** (C)1994,JPO&Japio

102b  
Claim 13

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-172218

(43)公開日 平成6年(1994)6月21日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>  
A 6 1 K 39/395  
G 0 1 N 33/53  
33/574

識別記号 庁内整理番号  
ADU D 9284-4C  
D 8310-2J  
A 9015-2J

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数4(全6頁)

(21)出願番号

特願平4-270492

(22)出願日

平成4年(1992)10月8日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年8月25日  
社団法人日本生化学会発行の「生化学Vo1.64, No. 8, 1992」に発表

(71)出願人 000003126

三井東圧化学株式会社  
東京都千代田区霞が関三丁目2番5号

(71)出願人 591038945

村松 畦  
鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘3丁目26-9

(72)発明者 村松 畦

鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘3丁目26-9

(72)発明者 村松 寿子

鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘3丁目26-9

(72)発明者 丸田 浩

オーストラリア国 ビクトリア 3050

(74)代理人 弁理士 若林 忠

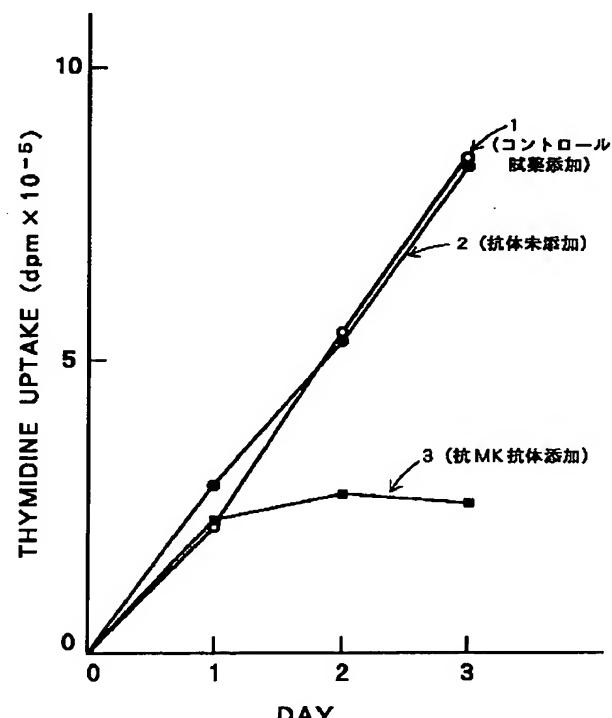
最終頁に続く

(54)【発明の名称】癌の診断、治療薬

(57)【要約】

【目的】新規な、癌の診断、治療薬の提供。

【構成】マウステラトカルシノーマ細胞由来成長分化因子であるMKタンパク質を動物に免疫して得られる抗体(抗MKタンパク質抗体)を調製し応用する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 MKタンパク質 (Midkine、MK) を動物に免疫して得られた抗体をアフィニティー精製を特徴とする処理過程を経て得られた抗MKタンパク質抗体。

【請求項2】 請求項1の抗MKタンパク質抗体を用いることを特徴とする癌の診断方法。

【請求項3】 請求項1の抗MKタンパク質抗体を含む癌の診断薬。

【請求項4】 請求項1の抗MKタンパク質抗体を含む癌の治療薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は新規な、癌の診断、治療薬に関するものであり、さらに詳しく言えば、MKタンパク質を動物に免疫して得られた抗体をアフィニティー精製を特徴とする処理過程を経て得られた抗MKタンパク質抗体（以下抗MK抗体と略記する）およびその製造法、また該抗MK抗体を用いることを特徴とする癌の診断方法および治療方法、また抗MK抗体を含む癌の診断薬および癌の治療薬に関する。

## 【0002】

【背景技術】 癌細胞に特異的に発現する抗原、酵素、あるいは発癌遺伝子産物タンパク質等の各種の癌関連抗原はこれまで幾多も発見され、それら多数の抗原に対してそれぞれ作製された抗体を用いて、癌の診断および治療が行われ、また試みられている。代表的な抗原としてα-フェトプロテインや癌胎児性抗原（CEA）などがあり、腫瘍マーカーとして、長年利用されてきた。体内各臓器の癌細胞、白血病細胞、さらに様々な増殖サイクル、増殖過程の癌細胞等に出現あるいは存在する癌関連抗原は、研究努力により今後も数多く見出され、それら新たな腫瘍マーカーを複数組み合わせ用いて、癌の診断さらには治療の成績はより向上するものと考えられる。

【0003】 本発明者らは、先にマウステラトカルシノーマ細胞由来の新たな成長分化因子を見出し、MKタンパク質、Midkineと命名し、またMidkine（以下MKと略記する）をコードするMK遺伝子をクローニングし、これら知見を報告した (Tomomura, M. et al, J. Biol. Chem., 265, 10765-10770, 1990)。このMidkineは118アミノ酸残基よりなるタンパク質で、その後の研究により、MKは各種神経細胞の神経突起伸長、生存維持、成熟の誘導をする作用を有することが明らかにされた (Muramatsu, H. and Muramatsu, T., Biochem. Biophys. Res. Commun., 177, 652-658, 1991)。

【0004】 本発明者らはついでマウスMK遺伝子を用いてヒトMK遺伝子をクローニングし (Tsutsui, J., Biochem. Biophys. Res. Commun., 176, 792-797, 1991)、さらにこれら遺伝子を動物細胞あるいは、大腸菌において発現させ、MKを調製することに成功し、特許出願した（特願平3-195397）。

## 【0005】

【発明の開示】 本発明者らは、このMKをマウスやウサギ等に免疫し抗体を作製し、さらにこのcrudeな抗体を、前記の大量にタンパク発現したMKを用いてアフィニティー精製することによりpureな抗体を調製したが、この抗MK抗体を使用して、神経細胞などの他にいくつかの癌細胞につき組織化学染色を試み、さらに癌細胞培養系に抗MK抗体を加えてみた。すると意外にも癌細胞の多くが該抗MK抗体により組織染色され、さらに癌細胞の培養系においては、癌細胞の増殖が相当程度、阻止されることを見出し、MKが癌関連抗原であることを明らかにするに至った。

【0006】 本発明はかかる際だった知見をもとに、鋭意研究を進め到達したものであるが、本発明の目的は、Midkineを動物に免疫して得られた抗体をアフィニティー精製を特徴とする処理過程を経て得られた抗MK抗体および該抗体の製造法を提供することである。本発明の他の目的は、抗MK抗体を用いることを特徴とする癌の診断方法および治療方法を提供することである。さらに本発明の目的は、抗MK抗体を含む癌の診断薬、癌の治療薬を提供することである。

【0007】 本発明の抗MK抗体は、たとえば以下の方法などにより得ることができる。免疫原であるMK抗原は、MK遺伝子をトランسفェクトしたL細胞の培養上清から種々のカラム操作を経て精製することができる。あるいはMKcDNAプローブを各種の発現ベクターに接続し、大腸菌、枯草菌、酵母等でタンパク発現させたMKを同様のカラム操作を経て得ることができる。免疫する動物はマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ウシなどの哺乳動物ほかが用いられる。MKを免疫した、これら各種動物の抗血清中に抗MKポリクローナル抗体を得ることができる。また免疫した各動物の脾細胞と骨髄腫細胞（ミエローマ細胞）株との融合によって抗MKモノクローナル抗体生産能を有するハイブリドーマを作製することができる。動物への免疫処理には、通常の方法を用いることができ、たとえば各種宿主動物の腹腔内、背中等の皮下、筋肉内、足躰等の皮内、血管内などにMKを適当なアジュバントとともに接種する。アジュバントとしてはフロイント完全アジュバント

（FCA）、フロイント不完全アジュバント（FIA）、Ribiアジュバント、リピドA、シリカ、免疫賦活剤などを用いることができる。免疫原のMKとアジュバントの混合物を初回免疫後、以後1~4週間おきに、好ましくは1~2週間ごとに腹腔内、皮下、筋肉内、血管内に追加免疫を2~10回程度反復して行った。またハイブリドーマ作製のための融合に用いるミエローマ細胞株としては、マウスNS-1株、SP-2/0株、X63-Ag8株、X63-6·5·3株、PAI株、MPC-11株などのマウス系のミエローマ細胞株やラット210.RCY.Ag1.2.3細胞株、YB2/0株などがあげられる。

【0008】 前記のようにして免疫した動物より血液を

採取し、抗血清を得、以下のようにしてアフィニティー精製を行い、抗MK抗体を調製することができる。アフィニティー精製のために、アガロース、セファデックス、セファロース4B (Pharmacia社製)、Afigel10 (Bio-Rad社製)、各種トヨパール (東ソー社製)などの担体にMKをカップリングする。抗原としてはMKそのもの、あるいはグルタチオン-S-トランフェラーゼ (GST) とMKの融合タンパク質などを用いる。MK溶液をカップリング溶液 (0.1M NaHCO<sub>3</sub>、pH8.3、0.5M NaCl含有) で一夜透析した後、このMK溶液に、やはりカップリング溶液で洗浄したBrCN活性化セファロース4B等の担体を加え、一夜攪拌した。ついで上清を除いた後、0.1M程度のエタノールアミン (pH8.0)などを加え、低温で一夜攪拌する。さらにこのMKカップリング担体懸濁液をグラスフィルターなどに移し、各種のバッファーで洗浄した後、MK結合担体を抗MK抗体のアフィニティー精製に用いた。MK結合セファロースなどをつめたカラムに抗MK抗血清をかけ、各種のバッファーで洗浄し、ついで酸性バッファーで溶出分画後、直ちにトリス・HCl pH9.5溶液を加え中和し、アフィニティー精製抗MK抗体溶液を得た。

【0009】本発明の抗MK抗体を癌の診断薬として用いる場合、ヒトや各動物の癌細胞、特に患者から摘出した組織片や細胞、あるいは患者から採取した血液、胸腔液、腹腔液等体液などにそれぞれ存在するMK抗原を、本発明の抗MK抗体を放射性同位元素標識、酵素標識、蛍光標識などして用いて、ラジオオートグラフィー、酵素抗体法、蛍光抗体法等により組織染色して、顕微鏡下で観察し検出することができる。あるいは細胞自動解析装置等を用いてMK抗原を分析することができる。癌細胞抽出液中あるいは体液中のMK抗原はRIA、EIA、FIAなどの方法で比色定量することができる。さらに患者体内の癌病巣を、<sup>67</sup>Ga、<sup>99m</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>Iなどの放射性同位元素などで標識した抗MK抗体で体内イメージングすることもできる。

【0010】一方本発明の抗MK抗体を癌の治療薬として用いる場合、アフィニティー精製した抗MKポリクローナル抗体やモノクローナル抗体あるいは酵素により断片化された抗体フラグメント自身を、さらにはこれら抗体に各種の抗癌剤や毒素等を結合させた複合体を、患者体内に投与して、抗癌治療を実施し、癌の増殖を阻止することができる。

【0011】本発明の抗MK抗体又は抗MK抗体-放射性同位元素結合物、抗MK抗体-抗癌剤複合体、抗MK抗体-毒素複合体を有効成分とする医薬組成物は、必要に応じた各種添加剤と混合することによって調製することができる。該添加剤としては、例えばアルブミン、ゼラチン、デキストラン、Tween 80などのポリソルベート系等の非イオン界面活性剤、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、脂肪酸アルコールエステル、ポリグリコールエーテル、リン酸緩衝生理食塩水、各種アミノ酸、デキストロ

ス、マンニトール、グルコース、キシリトール、乳糖、ショ糖、ガラクトース、フラクトース、マルトース、サツカロース、ソルビトールなどの糖類等を挙げることができ、これらの1種または2以上を組み合わせて用いることができる。

【0012】更に、本発明の医薬用組成物は、製薬的に許容される担体等の添加剤として、上記の例示物の他に、充填剤、結合剤、滑沢剤、湿润剤、崩壊剤、乳濁および懸濁液、保存剤、希釈剤、甘味剤あるいは芳香剤等として作用する各種物質を含有し得る。

【0013】これらの添加剤の例としては、どうもろこし澱粉、結晶セルロース、アラビアゴム、リン酸カルシウム、アルジネート、ケイ酸カルシウム、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン、トラガカントゴム、ゼラチン、シロップ、メチルセルロース、カルボキシメチセルロース、メチルヒドロキシ安息香酸エステル、プロピルヒドロキシ安息香酸エステル、タルク、ステアリン酸マグネシウム、不活性なポリマー類、水及び鉱油等が挙げられる。

【0014】なお、本発明の医薬組成物は、投薬の後の活性成分の放出速度が所望に応じて制御されるように处方しても良い。

【0015】静脈内点滴もしくは注射、あるいは筋肉内注射等の非経口投与の場合、例えば抗MK抗体、抗MK抗体-放射性同位元素結合物、抗MK抗体-抗癌剤等複合体などの有効量を、ブドウ糖水溶液、等張食塩水、無菌水あるいは類似の液体に溶解し、バイアルまたはアンプルに密封することができる。

【0016】なお、バイアルまたはアンプル剤とした場合には、その安定性を向上させるために、抗MK抗体、抗MK抗体-抗癌剤等複合体などの凍結乾燥品をバイアルやアンプル内で調製しても良い。本発明の医薬組成物中の、抗MK抗体、抗MK抗体-抗癌剤等複合体などの含有量は、必要に応じて適宜選択すれば良いが、例えば単位投薬量形状あたり、0.1 μg～50mg程度とすることができる。

#### 【0017】

【実施例】以下、参考例、実施例をもって本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 参考例1 MKの製造

前記のMK遺伝子をトランスフェクトしたL細胞 (10cmシヤーレ当たり5×10<sup>6</sup>) を無血清培地でヘパリン40 μg/mlの存在下で培養し、その培養上清11をフェニルセファロースCL-4Bカラム (2×12.7cm)、ヘパリンセファロースCL-6Bカラム (1.5×4.5cm) により、SDS-PAGE (銀染色) で単一バンドにまで精製し、セントリコン10で10mlにまで濃縮、脱塩してMKを200 μg製造した。

#### 参考例2 GST-MK融合蛋白質の製造

50 MKcDNAをグルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子を持

2pG-EX-2THベクターに導入し、大腸菌に感染させた。1の培養液から集菌し、100mlの50mM Tris-HCl、pH7.5、0.5%NP-40、25%スクロース液中でソニケイションにより菌体を破壊した。15,000×g 15分の遠心により上清を得た。この上清をグルタチオニアガロース（シグマ社製）(14ml)にかけ、洗浄後、5mMグルタチオンを含む50mM Tris-HCl、pH9.6で溶出して、60mgの融合タンパク質が得られた。

#### 実施例1 抗MKウサギ抗血清の調製（1）

参考例1で得たMKをウサギ（ニュージーランドホワイト種）に以下のように2週間おきに計4回免疫した。第1回免疫は、50μgのMKを0.5mlのPBS（ヘパリンを10mg/ml含有）に溶かし、フロイント完全アジュバント0.5mlを加え、乳化するまでよく混ぜて、足蹠に注射した。第2回免疫は、第1回と同量のMK（ヘパリン含有PBS中）0.5mlにフロイント不完全アジュバント0.5mlを加えて、第1回と同様に足蹠に注射した。第3回免疫および第4回免疫は、第1回、第2回と同量のMK（ヘパリン含有PBS中）0.5mlに、第2回と同様にフロイント不完全アジュバント0.5mlを加えて、背中の皮下に注射した。そして最終免疫の10日後、ウサギから全採取し、抗血清を調製した。

#### 実施例2 抗MKウサギ抗血清の調製（2）

参考例2で得たマウスおよびヒトMKを実施例1と同様の操作により、ウサギから抗血清を調製した。

#### 【0018】実施例3 アフィニティー精製抗MK抗体の製造

##### 1. GST-MK融合蛋白質とCNBr-activated Sepharose 4Bのカップリング

(1)参考例2で得たGST-MK融合蛋白質溶液（蛋白濃度4mg/ml）5mlをカップリングバッファー（0.1M NaHCO<sub>3</sub>、pH8.3、0.5M NaCl含有）で一夜透析した。  
(2)CNBr-activated Sepharose 4B 1g (1mM HCl、pH2.9に懸濁し、グラスフィルターに移して200mlの1mM HClで洗浄し、最後にカップリングバッファー100mlで洗浄した)を(1)の融合蛋白質溶液に加え、一夜（16～18時間）ミニプレートシェーカーで攪拌した。  
(3)上清を除き、0.1Mエタノールアミン（pH8.0）を5ml加え、(2)と同様に4°Cで一夜、ミニプレートシェーカーで攪拌した。  
(4)(3)をグラスフィルターに移し、洗浄バッファーA（0.1M酢酸緩衝液pH4.0、0.5M NaCl含有）200mlで洗浄し、次に洗浄バッファーB（0.1M Tris HCl pH8.0、0.5M NaCl含有、又は、カップリングバッファー）200mlで洗浄した。  
(5)(4)を更に2回繰り返した。

(6)0.1M glycine HCl pH2.7 100mlで余り時間はかけず、約10分間位で洗浄した。(7)20mMリン酸ナトリウム緩衝液pH6.8、100mlで洗浄し、同じ緩衝液に懸濁した。保存する場合は、1mM Na-azideを加えた。

##### 2. GST-MK融合蛋白質ーセファロースカラムを用いての

#### アフィニティークロマトグラフィー

- (1)GST-MK融合蛋白質-Sepharose 4B 2mlをカラムにつめた。
- (2)20mMリン酸ナトリウム緩衝液pH6.8で平衡化した。Na-azideを入れている場合はカラムの10倍量で洗った。
- (3)抗MKウサギ血清3mlをカラムにかけた。
- (4)20mMリン酸ナトリウム緩衝液pH6.8 (50ml)でカラムを洗浄した。
- (5)0.1MグリシンHCl pH2.7で溶出した。分画は2mlずつとし、10本までとった。この際、各分画（試験管）に予め、1MトリスHCl pH9.5、50μlを加えておき、溶出したものをすぐ中和した。蛋白の量は、OD280nmの吸収で測定した。ピークは、フラクション2と3であるが、フラクション6まで蛋白は溶出された。フラクション2～6を集め（IgG濃度が高いものを欲しい時はフラクション2、3だけを集めた）、BSAを1mg/mlになるように加えて、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に対して4°Cで充分透析した。

#### 【0019】実施例4 <sup>67</sup>Ga-デフェロキサミンメシレート（deferoxamine mesylate、以下DFOと略記する）-抗MK抗体の製造

##### (A) DFO-抗MK抗体-コンジュゲートの製造

PBSに2×10<sup>-5</sup>Mの濃度でDFOを溶解した溶液の1.0mlに、10%グルタルアルデヒド溶液10μlを加え、室温で5分間攪拌し、この反応混合液に、1.3mg/mlの濃度でPBSに溶解した抗MK抗体の溶液2mlを加え、0～4°Cで45分間攪拌した。次に、ナトリウムボロハイドライド（NaBH<sub>4</sub>）0.3mgを加え、さらに0～4°Cで2時間、泡が消えるまで攪拌した。次いで、この反応溶液をセファデックスG-50カラムで、PBSを溶出液として用い、ゲル濾過を行い、試験管1本当たり、1.0mlずつ溶出液を分取した。分取した溶出液の280nmでの吸光度を測定し、タンパク質分画の溶出されている試験管3本の溶液を集め、DFO-抗MK抗体-コンジュゲートを得た。

##### (B) (<sup>67</sup>Gaによる標識)

上記(A)項で得たDFO-抗MK抗体-コンジュゲート溶液（抗体として1.3mg/ml）50μlに、<sup>67</sup>GaCl<sub>3</sub> (400μCi/ml) 溶液10μgを混ぜ、更に、PBS200μlを加え、室温で30分間放置した。得られた反応溶液をセファデックスG-50カラムで、PBSを溶出液として用い、ゲル濾過を行い、試験管1本当たり1.0mlずつ溶出液を30本分取した。各試験管の放射能を測定し、放射能の高い試験管2本の溶液を集め、<sup>67</sup>Ga-DFO-抗MK抗体を得た。

#### 【0020】実施例5 <sup>111</sup>In-ジエチレントリアミンペンタ酢酸（diethylenetriamine-penta-acetic acid、以下DTPAと略記する）-抗MK抗体の製造

##### (A) DTPA-抗MK抗体-コンジュゲートの製造

0.1Mの炭酸水素ナトリウム0.1mlに、1.3mg/mlの濃度でPBSに溶解した抗GP68抗体の溶液0.9mlを加え、さらに抗G68抗体の250倍モルのDTPAを加え、室温で1時間放置し

た。次いでこの反応液をセファデックスG-50で、0.01M酢酸緩衝液(pH6.0)を用い、ゲルfiltrationを行い、試験管1本当たり2.0mlずつ溶出液を20本分取した。各試験管内の溶液の吸光度(280nm)を測定し、吸光度の高いタンパク質分画を含むvoid分画を集め、DTPA-抗MK抗体-コンジュゲートを得た。

(B)  $^{111}\text{In}$ による標識)

上記(A)項で得たDTPA-抗MK抗体-コンジュゲートの0.25mlに、 $^{111}\text{InCl}_3$  (250  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) 溶液0.02mlを混ぜ、さらに、0.01Mの酢酸緩衝液(pH6.0)0.23mlを加え、室温で30分間静置した。得られた反応液をセファデックスG-50で、PBSを溶出液として用い、ゲルfiltrationを行い、試験管1本当たり1.0mlずつ溶出液を30本分取した。各試験管内の溶液の放射能を測定し、放射能の高い2本の試験管内の溶液を集め、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-抗MK抗体を得た。

【0021】実施例6  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-抗MK抗体の製造

実施例3で製造したDTPA-抗MK抗体コンジュゲート0.25mlに1mg/mlの濃度の塩化スズ無水物生理食塩水溶液の0.1ml、1mg/mlの濃度のアスコルビン酸溶液の0.1ml及び $^{99m}\text{TcO}_4$  (20mCi/ml生理食塩水)0.1mlを加え、室温で30分間放置した。得られた反応液をセファデックスG-50カラムで、PBSを溶出液として用い、ゲルfiltrationを行い、分画し、放射能の高い画分を合わせて、 $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-抗MK抗体を得た。

【0022】実施例7  $^{67}\text{Ga}$ -DFO-抗MK抗体F(ab')<sub>2</sub>の製造

(A) (F(ab')<sub>2</sub>)フラグメントの製造)

抗MK IgG抗体4mg(25ナノモル)を0.1Mの濃度で食塩を含む0.1M酢酸緩衝液(pH4.5)1mlに溶かし、これに2.5%ペプシン(シグマ社製)を添加して、37°C、20時間静置した。得られた反応液を、セファデックスG-50カラムで、pH7.0のPBSを溶出液として用い、ゲルfiltrationを行い、溶出されたタンパク質画分を凍結乾燥して、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント1.6mgを得た。

(B) (DFO-抗MK抗体F(ab')<sub>2</sub>)フラグメント-コンジュゲートの製造)

実施例3の(A)項と同様にして、DFO-抗MK抗体F(ab')<sub>2</sub>フラグメント-コンジュゲートを製造した。

(C)  $^{67}\text{Ga}$ による標識)

実施例3の(B)項と同様にして、 $^{67}\text{Ga}$ -DFO-抗MKF(ab')<sub>2</sub>フラグメント-コンジュゲートを製造した。

【0023】実施例8  $^{125}\text{I}$ -抗MK抗体の製造

PBSに溶解した1.3mg/ml抗MK抗体溶液100  $\mu\text{l}$ と、 $^{125}\text{I-NaI}$  (74MBq/ml)10  $\mu\text{l}$ を混ぜ、更にPBS100  $\mu\text{l}$ 及びクロラミン-T(2mg/ml)溶液の10  $\mu\text{l}$ を加え、室温で30分間静置した。次に、10mg/mlのメタビサルフェトナトリウム20  $\mu\text{l}$ を加え反応を止めた。得られた反応溶液をセファデックスG-50カラムで、PBSを溶出液として用い、ゲルfiltrationを行い、 $^{125}\text{I}$ -抗MK抗体分画を得た。

【0024】実施例9  $^{131}\text{I}$ -抗MK抗体の製造

実施例8の $^{125}\text{I-NaI}$ の代わりに、 $^{131}\text{I-NaI}$ を用いる以外は、実施例7と同様の条件で反応及び後処理を行い、 $^{131}\text{I}$ -抗MK抗体分画を得た。

【0025】実施例1 抗MK抗体によるWilms'腫瘍細胞の増殖の阻害

1. Wilms'腫瘍細胞の培養

(1) Wilms'腫瘍細胞 (Japanese Cancer Research Resources Bank; 略称JCRB) を10%FCS含有McCoy5A培地(Nunc社製)を用いて、 $3 \times 10^4$ 個/ウェルの細胞数で24穴の組織培養皿にまいた。

(2) 翌日、0.1%FCS、ITS含有F12/DMEM培地(GLBCO社製、Ham's F12培地とDMEMを1:1の割合で混合し、0.1%FCS、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ インスリン、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ トランスフェリン、 $5 \times 10^{-8}$ Mアセレン酸ナトリウムを加えたもの)1mlで各ウェルを1回洗浄し、各ウェルに0.9mlずつ加えた。

(3) 精製抗MK抗体は、コントロール溶液を0.1ml/ウェル加えた。1つの実験群につき3ウェルずつ用意した。コントロールとして、免疫していないウサギの血清をGST-MK融合蛋白質-セファロースカラムにかけ、0.1Mグリシン緩衝液pH2.7で溶出した画分に1mg/mlのBSAを加え、PBSに対して透析した溶液を用いた。

(4) 8時間後、 $^3\text{H}$ -標識チミジン(以下 $^3\text{H-TdR}$ と略記する)を2  $\mu\text{Ci}/\text{ウェル}$ 加え、培養を続けた。

(5)  $^3\text{H-TdR}$ を加えてから、それぞれ16時間後 $^3\text{H-TdR}$ の取り込みを測定した。

(6) (4)の24時間後、さらに48時間後に別のウェルに $^3\text{H-TdR}$ を加え、その後(5)と同様の操作を行った。

2.  $^3\text{H-TdR}$ の取り込みの測定

(1) 各ウェルの培地を上清をアスピレーター等で吸い出した。

(2) 冷やしたPBS 2ml/ウェルで二度洗浄した。

(3) 酢酸/メタノール溶液(酢酸:メタノールを3:1の割合で混合する)を1ml/ウェル加えて、室温で10分間放置した。

(4) (3)を吸い出して、冷やした10%トリクロル酢酸(TCA)2ml/ウェルで洗浄した。

(5) 冷やした10%TCA 2ml/ウェルを加えて、4°Cで15分間置いた。この操作をもう一度繰り返した。

(6) 蒸留水2ml/ウェルで洗浄した。

(7) 0.2N NaOHを300  $\mu\text{l}/\text{ウェル}$ を加え、37°Cで2時間置いた。

(8) 1N HCl60  $\mu\text{l}/\text{ウェル}$ で中和し、ウェルごとにバイヤルに移し、放射能を測定し、3ウェルの平均値を算出した。結果を第1図に示す。抗MK抗体はWilms'腫瘍細胞の増殖をコントロールの30~40%にまで低下させた。

【0026】

【発明の効果】本発明により、MKが神経細胞の生存維持作用を持つこと以外に、Wilms'腫瘍などの癌細胞においてはオートクリン(autocrine)の腫瘍成長因子として働いていることが結論されたことにより、抗MK抗体は癌

関連抗原であるMKが発現している、広く各種の癌細胞を検出できることまたMKの発現している多くの癌細胞の増殖を阻止することが期待される。

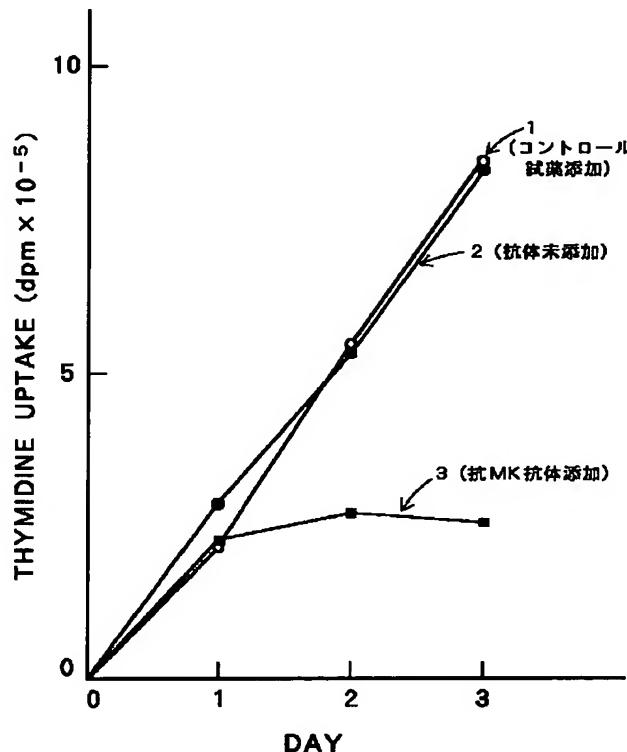
【0027】本発明は新たに製造された抗MK抗体を用いることを特徴とする癌の診断方法および治療方法、そして抗MK抗体を含む癌の診断薬および癌の治療薬を提供するものである。

\*

## \* 【図面の簡単な説明】

【図1】Wilms'腫瘍細胞の増殖が抗MK抗体によって阻止されることを示す図である。線1は、コントロール試薬添加の線（非免疫ウサギ血清をMK免疫ウサギ血清と同様にアフィニティカラムにかけて得られたコントロール試薬を添加）、線2は抗体未添加の線及び線3は抗MK抗体添加の線である。

【図1】




---

フロントページの続き

(72) 発明者 粟屋 昭  
神奈川県横浜市戸塚区戸塚町4978の1の  
206